

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



550324

(43) 国際公開日
2004 年 10 月 7 日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/086040 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 33/543

代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号 株式会社三菱化学
ヤトロン内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004083

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 24 日 (24.03.2004)

(74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒1730004 東京
都板橋区板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋中央ビル 5 階
Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-080763 2003 年 3 月 24 日 (24.03.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
三菱化学ヤトロン (MITSUBISHI KAGAKU IATRON,
INC.) [JP/JP]; 〒1010031 東京都千代田区東神田 1 丁目
1 1 番 4 号 Tokyo (JP). 大塚製薬株式会社 (OTSUKA
PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1018535
東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 立川 哲也
(TACHIKAWA, Tetsuya) [JP/JP]; 〒7710206 徳島県板
野郡北島町高房字東野神本 1 3 - 6 Tokushima (JP).
赤松 優 (AKAMATSU, Suguru) [JP/JP]; 〒7710212
徳島県板野郡松茂町中喜来字群恵 2 5 2 - 8
Tokushima (JP). 澤井 時男 (SAWAI, Tokio) [JP/JP]; 〒
1010031 東京都千代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号
株式会社三菱化学ヤトロン内 Tokyo (JP). 西村 文子
(NISHIMURA, Fumiko) [JP/JP]; 〒1010031 東京都千

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: LATEX REAGENT FOR ADIPONECTIN ANALYSIS AND METHOD OF ADIPONECTIN ANALYSIS

(54) 発明の名称: アディポネクチン分析用ラテックス試薬及びアディポネクチン分析方法

(57) Abstract: A latex reagent for adiponectin analysis which comprises a suspension of latex particles having deposited thereon a substance specifically bonding to adiponectin; and a method of adiponectin analysis which comprises a step (1) in which a biological liquid which may contain adiponectin is obtained and a step (2) in which the biological liquid obtained in the step (1) is contacted in that state with a suspension of latex particles having deposited thereon a substance specifically bonding to adiponectin and the resultant mixture is optically analyzed to determine the degree of coagulation of the latex particles. According to the latex reagent for adiponectin analysis and the method of analysis, the biological liquid as a test sample need not be diluted or treated beforehand. The analysis is speedy and simple, and facilities for examination are not limited.

(57) 要約: アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む、アディポネクチン分析用ラテックス試薬を開示する。また、(1) アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び(2) 前記工程で取得したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程を含む、アディポネクチン分析方法を開示する。前記アディポネクチン分析用ラテックス試薬及び分析方法に限定しない。

WO 2004/086040 A1

明 細 書

アディポネクチン分析用ラテックス試薬及びアディポネクチン分析方法

技術分野

本発明は、アディポネクチン分析用ラテックス試薬及びアディポネクチン分析方法に関する。なお、本明細書における前記「分析」には、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」と、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」との両方が含まれる。

背景技術

アディポネクチンは、1996年に松澤（大阪大学分子制御内科学、現：住友病院）等のグループにより、脂肪組織中に特異的に発現する遺伝子 a p M 1 (adipose most abundant gene transcript) の遺伝子産物として新たに同定された244個のアミノ酸からなる分泌タンパク質である（非特許文献1及び2）。アディポネクチンは、正常ヒト血中に数 μ g～数十 μ g/mLと高濃度に存在するが、脂肪細胞特異的分泌タンパク質でありながら、肥満者では有意に血中濃度が低値をとり、冠動脈疾患や2型糖尿病、特に大血管症合併例でアディポネクチンの低下を認める。また、アディポネクチンは、インスリン抵抗性及び動脈硬化双方にかかわる分子と捉えることができる。前記アディポネクチンを迅速且つ正確に測定することは、冠動脈疾患の予防上重要であると考えられる。

アディポネクチンの測定法のひとつとして、分析対象物質に対する抗体を利用する免疫学的測定方法が公知である（非特許文献3）。その免疫学的測定手段としては、抗原抗体反応により形成される免疫複合体を測定するために、放射性物質又は酵素を標識体として利用するラジオイムノアッセイ又はエンザイムイムノアッセイが研究用試薬として用いられている（非特許文献4, 5, 6, 7, 特許文献1, 2）。ラジオイムノアッセイ法では、放射性同位元素を使用するため、測定施設が限定され、通常、検体を500倍希釈することが必要であり、測定時間も20～24時間が必要となっている。また、エンザイムイムノアッセイに関

しては、通常、検体のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）による前処理が必要となり、検体を約5000倍の前希釈することが必要であり、測定時間も2時間以上が必要となっている。このように従来のアディポネクチン測定には、特定の施設が必要であったり、煩雑な操作と長い測定時間が必要であった。

前記の各種方法では、病態を鋭敏に反映する血液を検体とした場合、煩雑な操作と測定時間が長いことから汎用性が低く、多検体処理に向いていないのが現状である。従って、迅速且つ簡便であり、測定施設を限定しない自動分析測定試薬の開発が望まれている。

より具体的には、特許文献1には、遺伝子組み換え技術により大腸菌で発現させたアディポネクチンを免疫原として得られたモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を使用するアディポネクチン分析用ELISA法が開示されている。また、特許文献1には、このELISA法を用いて、正常人血漿中のアディポネクチン濃度を、前記血漿を前処理することなく、そのまま測定したところ、ウエスタンブロッティングの結果から予め予測されたアディポネクチン濃度が得られなかったこと、そして、その原因として、血中のアディポネクチンが他の血漿成分と会合して290kDa以上の大きな分子を形成しているため、抗体の認識部位がマスクされていることが考えられることが開示されている。特許文献1に記載のELISA法では、血漿をSDS含有バッファーで10倍に希釈して5分間煮沸処理し、更に、最終的に約5000倍に希釈して測定することにより、血漿中のアディポネクチンの測定を可能にしている。すなわち、特許文献1に記載のELISA法では、前処理（すなわち、SDS存在下での加熱処理）及び被検試料の前希釈が必須である。

このような前処理を不要とするアディポネクチン分析用ELISA法として、特許文献2には、血中の天然型アディポネクチンに特異的に反応するモノクローナル抗体（特には、アディポネクチンの3量体構造及び／又は前記3量体が凝集した構造を有する天然型アディポネクチンに特異的に反応するモノクローナル抗体）を用いるELISA法が開示されている。特許文献2の記載によれば、血中のアディポネクチンは、単量体3個から構成される3量体が更に4～6個ずつ凝集した存在形態をとっていることが知られており（非特許文献8）、天然型アデ

ィポネクチンに特異的に反応するモノクローナル抗体を用いることにより、被検試料の前処理を不要としている。しかし、特許文献2に記載のELISAでも、被検試料の前希釈は依然として必須の工程である。なお、特許文献2には、アッセイ系として、固相法、競合法、凝集法、比濁法、サンドイッチ酵素抗体法等が例示されているが、ELISAを用いることが特に好ましいことが記載されており、実施例もELISAについてしか記載されていない。

(非特許文献1) 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications)」, (米国), 1996年, 第221巻, p. 286-289

(非特許文献2) 「ジーン (Gene)」, (オランダ), 1997年, 第190巻, p. 227-235

(非特許文献3) 広瀬寛ら, 演題番号163 血清アディポネクチン濃度とインスリン抵抗性—健常人および2型糖尿病患者における検討, 「第75回 日本内分泌学会学術総会 抄録集」, 日本内分泌学会, 2002年, p. 118

(非特許文献4) 大本安一ら, アディポネクチンのELISAキットについて, 「バイオ・クリニカ (Bio Clinica)」, 2002年, 第17巻, p. 156-159

(非特許文献5) 大本安一ら, アディポネクチンELISAキットの開発と血中 存在様式の解析, 「メディカル・サイエンス・ダイジェスト」, 2002年, 第28巻, 第12号, p. 40-43

(非特許文献6) 「アーテリオスクレローシス・トロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology)」, (米国), 2003年, 第23巻, p. 85-89

(非特許文献7) 「サーキュレーション (Circulation)」, (米国), 2003年, 第107巻, p. 671-674

(非特許文献8) 「ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)」, 1996年, 第120巻, p. 803-812

(特許文献1) 国際公開第WO99/21577号パンフレット

(特許文献2) 国際公開第WO03/016906号パンフレット

発明の開示

本発明の課題は、従来技術の前記の欠点を解消し、被検試料である生物学的液体（例えば、血液、尿、細胞培養液、臓器抽出液、髄液、又は分泌液など、特に血液）を前希釈や前処理する必要がなく、迅速且つ簡便であり、しかも、測定施設を限定しない分析試薬（特には自動分析測定装置用の分析試薬）を提供することにある。

先述したとおり、公知のアディポネクチン分析用ELISA法では、特別な反応特異性を有するモノクローナル抗体（すなわち、アディポネクチンの3量体構造及び／又は前記3量体が凝集した構造を有する天然型アディポネクチンに特異的に反応するモノクローナル抗体）を使用しない限り、被検試料の前処理（例えば、SDS存在下での加熱処理）が必須である。また、いずれの公知のアディポネクチン分析用ELISA法においても、被検試料の前希釈は必須である。本発明者は、前希釈や前処理する必要がなく、迅速且つ簡便なアディポネクチン分析法の開発を目的として、ELISA法に代えてラテックス凝集法を検討する過程で、抗アディポネクチンポリクローナル抗体を用いることにより、前処理することなく、アディポネクチンの分析が可能であることを見出した。また、この方法では、被検試料の前希釈も不要であり、更には、実施例に実験データで具体的に示すように、前処理（SDS存在下での加熱処理）を必要とする公知のELISA法と良好な相関性が認められた。

一般的に、免疫学的分析方法では、試薬としての再現性の点から、近年は特にモノクローナル抗体を用いることが多く、ラテックス凝集法においても、モノクローナル抗体を用いることが多くなっている。このことは、前記特許文献1又は2に記載のアディポネクチン分析用ELISA法において、モノクローナル抗体を使用していることから明らかである。本発明者は、このような常識的なアプローチに反して、ポリクローナル抗体を用いることにより、意外にも、前記課題を解決することが可能であることを見出したものである。

前記課題は、本発明による、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む、アディポネクチン分析用ラテックス試薬により

解決することができる。

また、本発明は、（１）アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び

（２）前記工程で取得した生物学的液体を、前記工程で取得した状態のままで、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程を含む、アディポネクチン分析方法に関する。

図面の簡単な説明

図１は、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬を用いて、健常者検体を測定した結果を示すグラフである。

図２は、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬と、従来法であるEIA法との相関を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明では、その分析においてラテックス凝集反応を用いる。本発明における分析対象化合物であるアディポネクチンは、脂肪組織が分泌する生理活性物質である。アディポネクチンは、脂肪組織中に特異的に発現する遺伝子 a p M 1 (adipose most abundant gene transcript) の遺伝子産物として同定された 2 4 4 個のアミノ酸からなる分泌タンパク質であり (Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 221, p. 286-289, 1996 ; Gene, Vol. 190, p. 227-235, 1997) 、G B P 2 8 (gelatin-binding protein of 28 kDa) とも称されている (J. Biochem, vol. 120, p803-812) 。アディポネクチンは、正常ヒト血中に数 μ g ~ 数十 μ g / m L の濃度で存在するが、脂肪細胞特異的分泌タンパク質でありながら、肥満者では有意に血中濃度が低値をとり、冠動脈疾患や 2 型糖尿病、特に大血管症合併例でアディポネクチンの低下を認める。また、アディポネクチンは、インスリン抵抗性及び動脈硬化双方にかかわる分子と捉えることができる。前記アディポネクチンを迅速且つ正確に測定することは、冠動脈疾患の予防上重要であると考えられる。

本発明により分析可能な被検試料は、アディポネクチンを含有する可能性のある生物学的液体である限り、特に限定されるものではないが、例えば、生体から直接採取することにより得られる生体液〔例えば、血液（すなわち、全血）、尿、髄液、又は分泌液など〕、あるいは、生体から採取した生体材料（例えば、臓器、組織、又は細胞など）を処理して得られる生体材料由来液（例えば、臓器、組織、若しくは細胞の各種抽出液、又は組織若しくは細胞の各種培養液など）などを挙げることができる。

アディポネクチンは、例えば、正常ヒト血中には、数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （例えば、0.5～50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは2～30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは5～15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の濃度で存在する。

また、一般的な臨床検査用として調製した生体材料由来液中には、数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でアディポネクチンが存在する。あるいは、予備実験等により処理液（例えば、抽出用溶液又は培養用溶液）の量を適宜選択することにより、得られる生体材料由来液中のアディポネクチン濃度を数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とすることができる。

このように、本発明により分析可能な生物学的液体（特に血液）は、アディポネクチンを数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含むが、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬により、あるいは、本発明のアディポネクチン分析方法により、前希釈することなく、分析することができる。

本発明で用いるラテックス粒子としては、公知のラテックス粒子、例えば、ポリスチレン、又はスチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体等からなるラテックス粒子を挙げることができる。特異的結合体を担持するラテックスの平均粒径は、例えば、被検試料である生物学的液体の種類、アディポネクチンの含有濃度、又は測定機器などに応じて、通常、0.05～1.0 μm の範囲で適宜選択することができる。

例えば、血中アディポネクチンを分析する場合には、正常ヒト検体中に数 μg ～数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高濃度にアディポネクチンが存在すること、そして、肥満者では有意に血中濃度が低値になることから、前記ラテックス粒径を適宜選択することにより、血中アディポネクチンの測定系の測定範囲が保証可能となる。例え

ば、粒径が0.1 μm 以下では、臨床的意義の高い5 $\mu\text{g/mL}$ 以下の測定正確性が保証されないことがあり、粒径が0.5 μm 以上では、正常高値検体の測定ができなくなることがある。従って、血中アディポネクチンの測定系としては、平均粒径0.1～0.5 μm のラテックス粒子が好ましい。

本発明で用いる特異的結合体は、アディポネクチンと特異的に結合可能であって、しかも、ラテックス粒子に担持した状態でアディポネクチンを含む生物学的液体と接触させた場合にラテックス凝集反応が可能な結合体である限り、特に限定されるものではなく、例えば、抗体（モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体）、あるいは、アディポネクチンに特異的に結合可能なアプタマー（機能性RNA）を用いることができる。また、抗体の種類としては、免疫グロブリン分子自体のほか、抗体フラグメント、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂又はFv等も使用可能である。

特異的結合体として抗体を用いる場合には、前記抗体として、例えば、アディポネクチン又はその誘導体（例えば、アディポネクチンの断片、又はアディポネクチン若しくはその断片を含む融合ポリペプチド）を免疫原として得られる抗体を用いることができ、アディポネクチン又はその誘導体を免疫原として得られるポリクローナル抗体、あるいは、被検試料中に存在する可能性のあるアディポネクチンにおいて外側に露出するエピトープと反応するモノクローナル抗体（特に、アディポネクチンの単量体を免疫原として得られ、且つ被検試料中に存在する可能性のあるアディポネクチンにおいて外側に露出するエピトープと反応するモノクローナル抗体）が好ましい。なお、前記アディポネクチンには、種々の形態のアディポネクチン、例えば、アディポネクチンの単量体、二量体、若しくは三量体、又はそれらの凝集体が含まれる。

前記免疫原としては、遺伝子組み換え技術を用いて調製したアディポネクチン又はその誘導体、あるいは、天然のアディポネクチンを使用することができる。

遺伝子組み換え技術を用いて調製したアディポネクチン又はその誘導体を免疫原として得られる抗体は、例えば、国際公開第WO99/21577号パンフレットに記載の方法により取得することができる。具体的には、適当な宿主（例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞）を用いてアディポネクチン又

はその誘導体を発現させ、例えば、大腸菌を宿主として用いた場合には、可溶性画分や、インクルージョンボディとして得られた菌体内に蓄積されたアディポネクチン又はその誘導体を、適当な変性剤（例えば、塩酸グアニジン又は尿素）の存在下にて可溶化した後、リフォールディングすることにより、免疫原として用いることのできるアディポネクチン又はその誘導体を調製することができる。

天然のアディポネクチンを免疫原として得られる抗体は、例えば、国際公開第WO 03/016906号パンフレットに記載の方法により取得することができる。具体的には、アディポネクチンのゼラチン結合性を利用して、例えば、大量のヒト血漿をゼラチン結合カラムを通すことにより、免疫原として用いることのできるアディポネクチンを調製することができる。被検試料中に存在する可能性のある天然のアディポネクチンとしては、例えば、アディポネクチンの単量体、二量体、若しくは三量体、又はそれらの凝集体、更にはプロテアーゼで切断分離されることにより生じるグロブリン領域を挙げることができる。

得られた免疫原を、常法に従って、動物（例えば、ウサギ）に免疫することにより、ポリクローナル抗体を得ることができ、また、前記免疫原を用いてハイブリドーマを作製することにより、モノクローナル抗体を得ることができる。

ラテックス担体の感作は、任意の公知の方法で実施することができ、例えば、抗体を用いる場合には、ラテックス担体に抗体を物理的又は化学的に結合させることにより感作することができる。

本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬は、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む限り、その形態は特に限定されるものではないが、例えば、特異的結合体（例えば、抗アディポネクチン抗体）を感作したラテックス粒子と緩衝液との両方を含む1液系の試薬；あるいは、緩衝液である第1試薬と、特異的結合体（例えば、抗体）を感作したラテックス粒子を含む第2試薬とで構成される2液系の試薬など、種々の形態であることができる。

本発明のアディポネクチン分析方法は、アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得した後、取得した前記生物学的液体に対して前希釈及び／又は前処理することなく、取得した状態のままで、アディポネクチンに対する特異

的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触させる。

例えば、自動分析測定装置を用いて本発明のアディポネクチン分析方法を実施する場合には、生物学的液体を取得した後、前記生物学的液体を自動分析測定装置に装入する前には、前希釈及び／又は前処理を実施しない。より具体的には、生物学的液体を取得した後、取得した前記生物学的液体に対して前希釈及び／又は前処理することなく、取得した状態のままで、自動分析測定装置内において、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触させる。

すなわち、本発明方法の好適態様の１つである、自動分析測定装置を用いるアディポネクチン分析方法は、

- （１）アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び
 - （２）前記工程で取得した生物学的液体を、前記工程で取得した状態のままで、自動分析測定装置内において、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程
- を含む。

本明細書において、「前希釈」とは、生物学的液体を取得した後であって、しかも、ラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触する前に実施する希釈、例えば、従来の免疫学的測定法（例えば、ラジオイムノアッセイ又はエンザイムイムノアッセイ）で必要とされる検体の希釈（例えば、可溶化のための希釈工程）を意味する。また、「前処理」とは、生物学的液体を取得した後であって、しかも、ラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触する前に実施する種々の処理、例えば、夾雑物の物理的若しくは化学的分離、又は生物学的液体の化学的変性〔例えば、エンザイムイムノアッセイで必要とされる検体の可溶化剤又は界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム）による変性〕などを意味する。

なお、ラテックス粒子懸濁液として、緩衝液である第１試薬と、特異的結合体

を感作したラテックス粒子を含む第2試薬とで構成される2液系からなる本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬を用いる場合、通常、生物学的液体と第1試薬とを接触させた後、第2試薬を接触させる。この場合、第1試薬である緩衝液により生物学的液体が希釈されるが、この希釈は、汎用自動分析装置の測定において約5分間のインキュベーションとして必ず行われるものであり、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬と接触する前の「前希釈」には該当しない。

各種生物学的液体、例えば、血液中のアディポネクチン測定は、従来の測定方法であるラジオイムノアッセイ又はエンザイムイムノアッセイを用いた場合には、例えば、500～5000倍に検体を希釈するステップを必要としている。また、エンザイムイムノアッセイでは、検体を可溶化剤又は界面活性剤〔例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）〕で処理するステップを必要としている。

それに対して、本発明のアディポネクチン分析方法では、例えば、ラテックス粒子の粒径を適宜選択する（例えば、血中アディポネクチンの場合には、0.1～0.5 μm の粒径が好ましい）ことにより、検体の前希釈や前処理を必要とせず、原液を試料としてラテックス凝集反応を実施することが可能である。

本発明のアディポネクチン分析方法においては、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子（例えば、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）を用いて凝集反応を行い、生じた凝集の度合い（凝集度）を光学的に分析（特には測定）することにより、生物学的液体中（例えば、血中）のアディポネクチンの量を分析（特には測定）することができる。ラテックス粒子の凝集度を光学的に分析する具体的方法においては、例えば、目視的に観察するか、あるいは、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度を測定する光学機器を用いて測定を行うことができる。好ましい測定波長は300～800 nmである。測定方法は、公知の方法に従い、用いるラテックス粒子の大きさ（平均粒径）若しくは濃度の選択、又は反応時間の設定により、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度の増加又は減少を測定することにより行うことができる。また、これらの方法を併用することも可能である。

一般的に、ラテックス凝集反応の測定系に存在させる特異的結合体感作ラテッ

クスの濃度は、例えば、共存する塩、タンパク質、又は糖類等の添加物の濃度によって適宜選択することができる。一般には、反応系の最終液量の濃度として、特異的結合体感作ラテックスが好ましくは0.05～10mg/mL、より好ましくは0.1～2mg/mLになるように、調製することができる。特異的結合体感作ラテックスの濃度が低すぎると、凝集反応の低濃度測定が充分でなくなることがあり、高すぎると、凝集反応の高濃度測定が充分でなくなり、再現性が悪くなることもある。

本発明においては、特異的結合体感作ラテックスの凝集反応に影響を与える他の因子を調節することによって、ラテックス粒子凝集反応を更に精密に測定し、低濃度域及び高濃度域の定量可能範囲を更に拡張させることができる。ラテックス凝集反応に影響を与える他の因子としては、例えば、ラテックス粒子の濃度、ラテックス粒子上の抗体感作量、又はラテックス粒子の粒径等を挙げることができる。

本発明のアディポネクチン分析方法におけるラテックス凝集反応の条件は、通常の条件と同様であってよく、反応媒体としては、各種生物学的液体中のアディポネクチン分析に応じた各種緩衝液が適宜選択することができる。血中アディポネクチンを分析する場合には、この緩衝液は、血中アディポネクチンを失活させることがなく、しかも、ラテックス凝集反応を阻害しないようなイオン強度やpHを有するものであれば、特に限定されるものではない。例えば、グッド緩衝液、グリシン緩衝液、又はトリス緩衝液などが使用可能である。反応のpHは、5～10、特に6～8が好ましい。反応温度は0～50℃、特に20～40℃が好ましい。反応時間は適宜決定することができる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：アディポネクチン測定試薬の調製

(1) 抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液の調製

ウサギ由来の抗ヒトアディポネクチンポリクローナル抗体を0.5mg/mL

の濃度で0.01mol/Lトリス緩衝液(pH8.0)に溶解した液9mLに、平均粒径0.2 μ mのポリスチレンラテックス(固形分10重量%)1mLを添加し、室温にて60分間攪拌した。次いで、この液に、ウシ血清アルブミンを0.5重量%含有するトリス緩衝液(pH8.0)を添加し、室温にて60分間攪拌した後、この混合液を20000rpmで遠心分離した。得られた沈殿物にトリス緩衝液(pH8.0)10mLを添加し、ラテックスを懸濁させ、抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液を調製した。

なお、本実施例で使用した前記ポリクローナル抗体は、国際公開第WO99/21577号パンフレットの実施例1に記載の方法により調製したポリクローナル抗体であり、より詳細には、遺伝子組み換え技術を用いて調製したアディポネクチンを免疫原として得られたポリクローナル抗体である。

本実施例では、同一の調製操作に基づく3種類の抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液(ロット01~ロット03)を調製し、以下の実施例2で評価した。

(2) 緩衝液の調製

0.5%(重量%)濃度でウシ血清アルブミンを含有する0.1mol/Lトリス緩衝液(pH8.0)に、0.9%(重量%)濃度の塩化ナトリウムを添加して緩衝液とした。

(3) ヒトアディポネクチン抗原測定試薬

本実施例で使用するヒトアディポネクチン抗原測定試薬は、前記実施例1(2)で調製した緩衝液からなる第1試薬と、前記実施例(1)で調製した抗アディポネクチン抗体感作ラテックスからなる第2試薬とからなる2液系の試薬として構成した。

(4) 標準アディポネクチン抗原液

痩身者検体より選択したアディポネクチン高濃度血清を生理食塩水で希釈し、既知濃度のアディポネクチンを含む標準アディポネクチン抗原液を作製した。

実施例2：血中アディポネクチンの測定

(1) 血中アディポネクチンの測定

測定検体(痩身者検体から採取した血液)2 μ Lに、実施例1(2)で調製した緩衝液90 μ Lを混合し、37°Cで適時保持した後、実施例1(1)で調製し

た抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液90 μ Lを添加攪拌し、この後、5分後の波長570nmでの吸光度を測定した。この間の吸光度の変化量を吸光度変化量(ΔAbs)とした。標準アディポネクチン抗原液から得られる ΔAbs とその抗原濃度とから検量線を作成した。その検量線を用いて、被検サンプルの ΔAbs からアディポネクチン値を計算した。測定は、日立自動分析装置7170型を用いて行った。

結果を表1及び図1に示す。表1及び図1に示すように、抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液ロット01~03は、アディポネクチン希釈理論値の低濃度域から高濃度域まで測定可能であることが確認された。

表1

試薬ロット アディポネクチン 希釈理論値 μ g/mL	ロット 01 感度 $Abs \times 10^4$	ロット 02 感度 $Abs \times 10^4$	ロット 03 感度 $Abs \times 10^4$
0.00	-3	-2	-2
0.20	13	10	12
0.39	26	25	28
0.79	52	52	54
1.18	81	78	82
1.57	108	106	110
1.97	135	133	138
2.36	162	164	164
2.75	191	188	196
3.14	220	215	220
3.54	248	245	254
3.93	275	273	284
7.86	570	567	582
11.79	860	844	877
15.72	1161	1140	1182
19.65	1443	1415	1456
23.58	1707	1680	1722
27.51	1947	1895	1982
31.44	2164	2110	2201
35.37	2342	2311	2405
39.30	2497	2486	2562
47.16	2679	2626	2724
70.74	3071	2990	3115
94.32	3134	3052	3189
117.90	3042	2968	3138

(2) 最小検出限界の決定

測定検体として、健常者検体を用いたこと以外は、実施例2(1)の操作を繰り返した。

結果を表2に示す。表において、各記号「N」、「MAX」、「MIN」、「RANGE」、「MEAN」、「SD」、及び「CV」は、それぞれ、「測定対象数」、「最大値」、「最小値」、「最大値と最小値との差」、「平均値」、「標準偏差」、及び「変動係数」を意味する。

表2から、 $0\mu\text{g/mL}$ の ΔAbs の $\text{MEAN}+2\text{SD}$ と、 $\text{MEAN}-2\text{SD}$ が重ならない濃度は、 $0.1\mu\text{g/mL}$ であることが確認された。

表 2

[illegible]

(3) E I A法との相関性の確認

本発明のラテックス法は、測定検体として、健常者検体を用いたこと以外は、実施例 2 (1) の操作を繰り返した。

また、E I A法は、市販研究用試薬（ヒトアディポネクチンELISAキット；大塚製薬株式会社）を用いて実施した。このE L I S A試薬は、国際公開第WO 9 9 / 2 1 5 7 7号パンフレットに記載のE L I S A法に基づいた市販試薬であり、抗アディポネクチン抗体として、遺伝子組み換え技術を用いて調製したアディポネクチンを免疫原として得られるモノクローナル抗体とポリクローナル抗体との組み合わせを使用するものであり、被検試料の前処理（S D S 存在下での加熱処理）及び希釈操作を必要とする。

結果を図 2 に示す。図 2 から、市販研究用試薬である E I A 法との相関性は、 $Y = 0.9938x - 0.0015$ ($R = 0.9889$) と良好な相関性が確認された。

(4) 夾雑物の影響の確認

測定検体として、健常者検体に各種夾雑物（ビリルビン F、ビリルビン C、ヘモグロビン、乳ビ、イントラファット、又はリウマチ因子）を所定濃度添加した検体を用いたこと以外は、実施例 2 (1) の操作を繰り返した。

結果を、表 3 ～ 表 1 4 に示す。表 3 ～ 表 1 4 から、ビリルビン F、ビリルビン C、ヘモグロビン、乳ビ、イントラファット、及びリウマチ因子（RF）の各共存物質の各濃度における影響は、全て ± 1 0 % 以内であることが確認された。

表 3

ビリルビン F	添加濃度 (mg/dL)	検体 1	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	2.14	100.0%
1/5	6.0	2.10	98.0%
2/5	12.0	2.09	97.5%
3/5	18.0	2.09	97.5%
4/5	24.0	2.09	97.5%
5/5	30.0	2.06	96.3%

表 4

ビリルビン F	添加濃度 (mg/dL)	検体 2	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	6.45	100.0%
1/5	6.0	6.45	100.1%
2/5	12.0	6.42	99.5%
3/5	18.0	6.41	99.3%
4/5	24.0	6.43	99.6%
5/5	30.0	6.44	99.8%

表 5

ビリルビン C	添加濃度 (mg/dL)	検体 1	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	2.07	100.0%
1/5	6.0	2.05	99.2%
2/5	12.0	2.08	100.5%
3/5	18.0	2.05	99.2%
4/5	24.0	2.06	99.7%
5/5	30.0	2.08	100.6%

表 6

ビリルビン C	添加濃度 (mg/dL)	検体 2	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	6.41	100.0%
1/5	6.0	6.41	100.0%
2/5	12.0	6.43	100.3%
3/5	18.0	6.45	100.6%
4/5	24.0	6.41	99.9%
5/5	30.0	6.37	99.4%

表 7

ヘモグロビン	添加濃度 (mg/dL)	検体 1	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	2.06	100.0%
1/5	100.0	2.06	100.0%
2/5	200.0	2.04	99.2%
3/5	300.0	2.06	100.3%
4/5	400.0	2.08	101.1%
5/5	500.0	2.06	100.2%

表 8

ヘモグロビン	添加濃度 (mg/dL)	検体 2	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	6.40	100.0%
1/5	100.0	6.43	100.5%
2/5	200.0	6.26	97.9%
3/5	300.0	6.38	99.7%
4/5	400.0	6.39	99.8%
5/5	500.0	6.41	100.3%

表 9

乳び	添加濃度 (濁度)	検体 1	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	2.12	100.0%
1/5	400.0	2.13	100.5%
2/5	800.0	2.07	97.8%
3/5	1200.0	2.06	97.0%
4/5	1600.0	2.11	99.7%
5/5	2000.0	2.07	97.6%

表 1 0

乳び	添加濃度 (濁度)	検体 2	
		測定値 ($\mu\text{g/mL}$)	回収率 (%)
0/5	0.0	6.38	100.0%
1/5	400.0	6.37	99.8%
2/5	800.0	6.34	99.4%
3/5	1200.0	6.35	99.4%
4/5	1600.0	6.38	99.9%
5/5	2000.0	6.44	100.9%

表 1 1

イントラファット	添加濃度 (%)	検体 1	
		測定値 ($\mu\text{g/mL}$)	回収率 (%)
0/5	0.0	2.10	100.0%
1/5	1.0	2.12	100.8%
2/5	2.0	2.10	100.0%
3/5	3.0	2.14	101.9%
4/5	4.0	2.15	102.2%
5/5	5.0	2.13	101.3%

表 1 2

イントラファット	添加濃度 (%)	検体 2	
		測定値 ($\mu\text{g/mL}$)	回収率 (%)
0/5	0.0	6.42	100.0%
1/5	1.0	6.42	100.0%
2/5	2.0	6.44	100.3%
3/5	3.0	6.34	98.7%
4/5	4.0	6.32	98.4%
5/5	5.0	6.31	98.2%

表 1 3

R F	添加濃度 (IU/mL)	検体 1	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	2.10	100.0%
1/5	50.0	2.06	98.1%
2/5	100.0	2.05	97.3%
3/5	150.0	2.10	100.0%
4/5	200.0	2.03	96.7%
5/5	250.0	2.12	100.6%

表 1 4

R F	添加濃度 (IU/mL)	検体 2	
		測定値 (μ g/mL)	回収率 (%)
0/5	0.0	6.42	100.0%
1/5	50.0	6.30	98.2%
2/5	100.0	6.39	99.6%
3/5	150.0	6.27	97.8%
4/5	200.0	6.30	98.2%
5/5	250.0	6.42	100.1%

産業上の利用可能性

本発明によれば、ラテックス粒子を使用し、ラテックス凝集反応に基づく生物学的液体中（好ましくは血中）のアディポネクチンの分析において、検体を前処理することや、前希釈することなく、低濃度領域から高濃度領域まで測定範囲を拡大することができる。また、迅速且つ簡便であり、しかも、測定施設を限定しない。

近年、多数の被検試料を短時間に処理するための自動分析装置が普及し、更に高感度化が要求されることと相まって、特に、抗体（又は抗原）を結合したラテックス粒子との凝集反応を利用するラテックス凝集法が汎用されている。本発明によれば、前処理及び／又は前希釈を必要としないので、短時間（例えば、約 1

0分～15分)で測定が可能である。本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬(好ましくは、血液中のアディポネクチン分析用ラテックス試薬)は、自動分析測定装置用の分析試薬として適している。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む、アディポネクチン分析用ラテックス試薬。
2. 前記特異的結合体が抗アディポネクチンポリクローナル抗体である、請求項1に記載のアディポネクチン分析用ラテックス試薬。
3. (1) アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び
(2) 前記工程で取得した生物学的液体を、前記工程で取得した状態のままで、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程を含む、アディポネクチン分析方法。
4. 前記特異的結合体が抗アディポネクチンポリクローナル抗体である、請求項3に記載のアディポネクチン分析方法。

1/1

FIG. 1

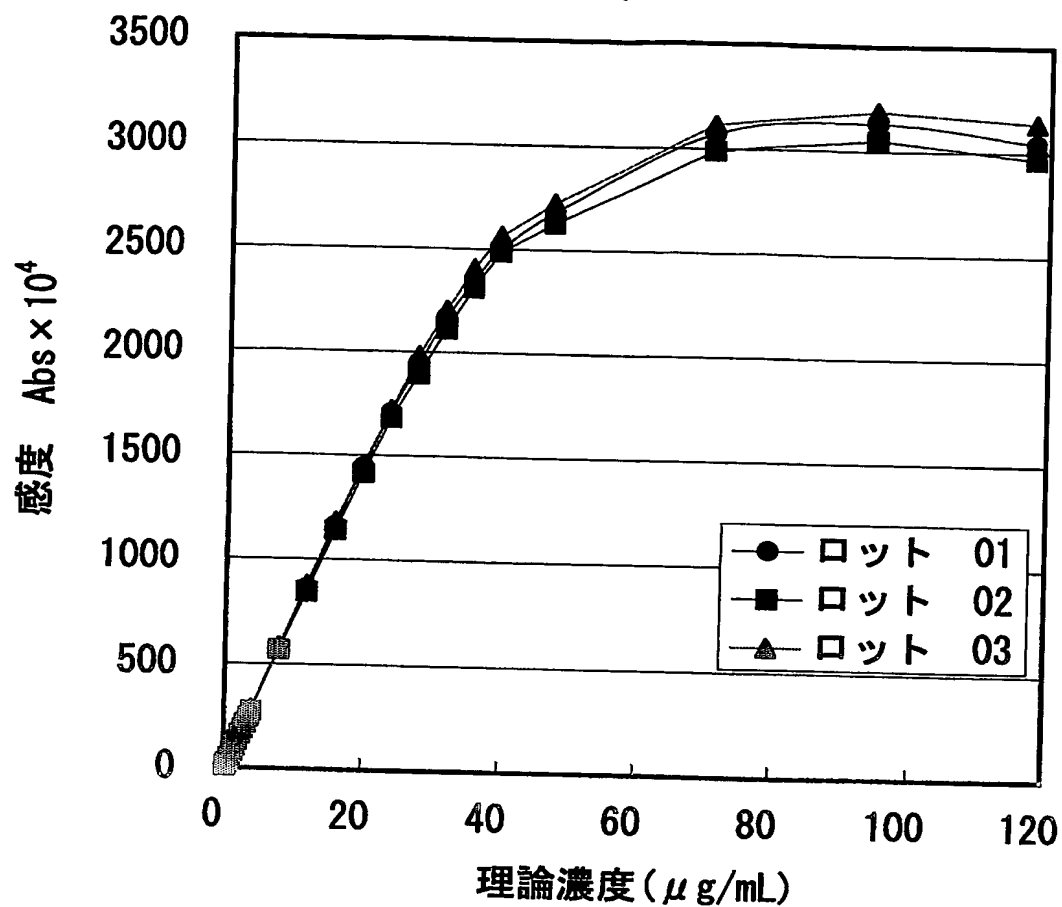
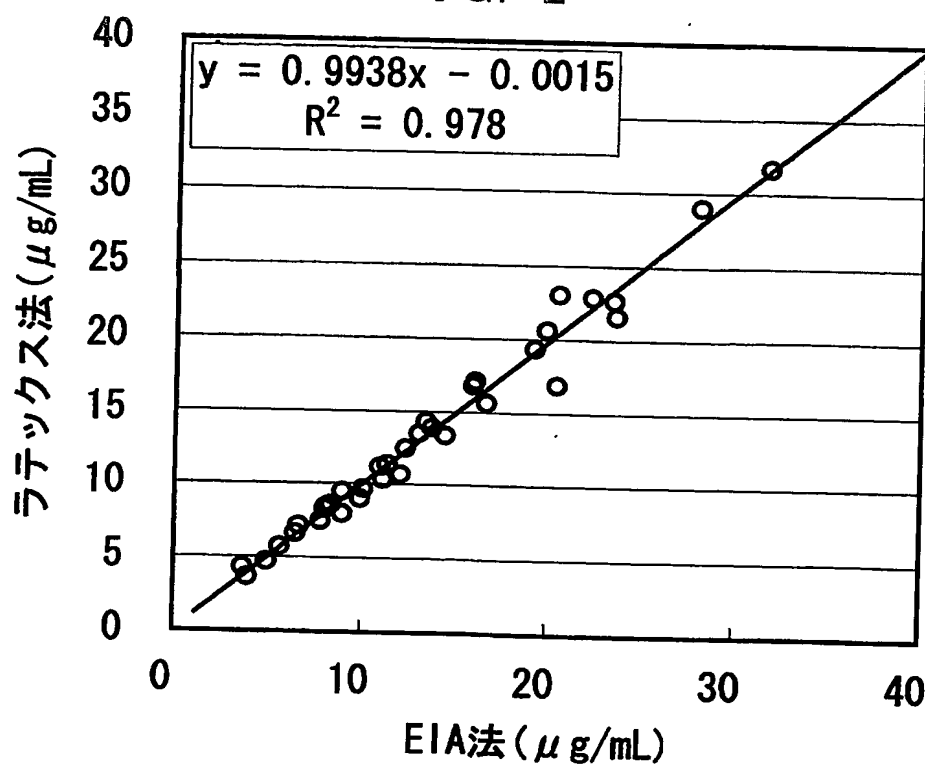


FIG. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/21577 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 May, 1999 (06.05.99), & EP 1033134 A & US 6461821 B	1-4
Y	JP 2001-4624 A (A&T Corp.), 12 January, 2001 (12.01.01), (Family: none)	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 April, 2004 (22.04.04)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 33/53 G01N 33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N 33/53 G01N 33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 99/21577 A(大塚製薬株式会社)1999.05.06 & EP 1033134 A & US 6461821 B	1-4
Y	JP 2001- 4624 A(株式会社エイアンドティー)2001.01.12 (ファミリー無し)	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 宮澤 浩

2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251